پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات ۶۸ تا ۷۵

مقاله اصلی
(Original Article)

تایپینگ مولکولی سویه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* جدا شده از بیماران بستری به روش PCR-Ribotyping

مهدی گودرزی[۱و۲]، حسین گودرزی[۲]، مسعود آل بویه[۱]، معصومه عظیمی‌راد[۱]، محمدرضا زالی[۱]، محمدمهدی اصلانی[*۱و۳]

[۱] مرکز تحقیقات گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور تهران

چکیده

سابقه و هدف: *عفونت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل معضل در حال گسترشی در بیمارستان است که شیوع بالایی از آن در سال‌های اخیر گزارش شده است. شناسایی منبع عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در کنترل و جلوگیری از گسترش عفونت بیمارستانی ناشی از آن از اهمیت به سزایی برخوردار است. با توجه به اینکه روش PCR ribotyping اخیرا به عنوان روشی موثر در مطالعه اپیدمیولوژیکی سویه‌های کلستریدیوم دیفیسیل پیشنهاد شده است، این تحقیق انجام گرفت.*

روش بررسی: *مطالعه در طی یک دوره ۱۲ ماهه به صورت توصیفی صورت پذیرفت. ۱۷ نمونه کلستریدیوم دیفیسیل از بیماران مشکوک به عفونت با کلستریدیوم دیفیسیل جداسازی گردید. تمامی نمونه‌های مدفوع با شوک الکل و محیط عصاره مخمر تیمار شدند. سپس از سوسپانسیون تیمار شده روی محیط اختصاصی سیکلوسرین سفوکسیتین فروکتوز آگار(CCFA) غنی شده با ۵ درصد خون گوسفند به روش خطی کشت و در شرایط بیهوازی تا ۵ روز انکوبه شدند. شیوع ایزوله‌ها تعیین و میزان واقعی آن (Confidence Interval) در جامعه برآورد گردید. برای تعیین هویت قطعی، ژن cdd-3 و همچنین تعیین پروفایل توکسینی، ژن‌های tcdA،tcdB با استفاده از روش PCR شناسایی شدند. جهت شناسایی ریبوتایپ بر روی نمونه‌های کلستریدیوم دیفیسیل بدست آمده از بیماران بستری در بیمارستان با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ریبوزومی PCR گذاشته شد.*

یافته‌ها: *از ۱۰۸ نمونه ارسالی، ۱۷(۱۵/۷٪) نمونه مثبت بود. فراوانی ایزوله‌های با پروفایل توکسینی A^+B^+ ۱۲ (۷۰/۵۹٪)، A^-B^- ۱(۵/۹٪) و A^-B^+ ۴ (۲۳/۹٪) گزارش شد. آنالیز ریبوتایپینگ ایزوله‌ها نشان داد که تمامی آنها دارای الگوی باندی متفاوت هستند.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که ریبوتایپ‌های در حال گردش در بخش‌های مختلف بیمارستان متفاوت بوده و عفونت ممکن است به دلیل سویه‌های اندوژن یا کسب سویه‌های بیماری‌زا از محیط باشد.*

واژگان کلیدی: *کلستریدیوم دیفیسیل، توکسین، ریبوتایپینگ.*

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل، باسیل گرم مثبت بیهوازی تولید کننده اسپور است که از خاک و آب و فاضلاب و ۱-۳ درصد از روده اشخاص سالم و نیز به عنوان عامل پاتوژن در بیش از ۲۰ درصد بیماران بستری در بیمارستان جداسازی شده است (۱، ۲). بیماری ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* بیشتر در افراد بستری در بیمارستان به دنبال دریافت آنتی‌بیوتیک ایجاد می‌گردد. در اثر استفاده مکرر از داروهایی مثل آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و کلیندامایسین فلور نرمال روده تغییر و در نهایت سبب جایگزینی و رشد بیش از حد *کلستریدیوم دیفیسیل* در روده و باعث ایجاد علایم بالینی مرتبط با این باکتری می‌گردد (۳، ۴). این ارگانیزم،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور، محمد مهدی اصلانی
(**e-mail:** mmaslani@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۲/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۳/۲۸

مسئول ایجاد بیماری با طیف وسیعی است که از یک اسهال خودبخود محدود شونده تا درد شدید شکم، کولیت با غشاء کاذب، کولیت تحریک پذیر، سوراخ شدن روده، مگاکولون توکسیک و مرگ می‌تواند متغیر باشد (۵).

عفونت *کلستریدیوم دیفیسیل* (CDI) عامل اصلی مرگ و میر در عفونت‌های مرتبط با بیمارستان‌ها و موسسات بهداشتی و درمانی به خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۷،۶). شدت عفونت با *کلستریدیوم دیفیسیل* بیانگر توانایی این میکروارگانیزم در تولید توکسین‌های پیش التهابی در روده بزرگ می‌باشد (۸).

انتروپاتوژنیسیته این باکتری مرتبط با تولید انتروتوکسین A (308 kDa) و سیتوتوکسین B (207kDa) است (۱۰،۹). در برخی از سویه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* توکسینی بنام Binary toxin شرح داده شده است که به تنهایی در ویرولانس باکتری و بیماری‌زایی آن به خصوص در سویه‌های غیر توکسین‌زا نقش مهمی را ایفاء می‌کند. این در حالی است که سویه‌های با توانایی تولید توکسین نوع B و عدم توانایی در تولید توکسین A نیز از نظر بالینی بسیار مهم و حائز اهمیت می‌باشند (۱۲،۱۱). عفونت‌های شدید و کشنده *کلستریدیوم دیفیسیل*، از اسهال آبکی تا کولیت با غشاء کاذب در ارتباط با تیپ های خاصی از این باکتری می‌باشند.

برای بررسی تعیین تیپ این ارگانیزم از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مختلف استفاده می‌شود. اولین روش‌های تایپینگ بر پایه خصوصیات فنوتیپی باکتری انجام می شد (۱۳)، ولی با توجه با آنکه روش‌های تعیین تیپ باکتری بر پایه خصوصیات فنوتیپی برای مطالعات اپیدمیولوژیک و نیز بررسی منشا عفونت‌های حاصل از این باکتری چندان رضایت‌بخش نبوده است امروزه بیشتر از روش‌های تعیین تیپ بر پایه خصوصیات مولکولی استفاده می‌شود (۱۴). از بین روش‌های مولکولی برای تعیین تیپ *کلستریدیوم دیفیسیل*، روش PCR ribotyping روش استاندارد برای تعیین تیپ در کشورهای اروپایی و روش PFGE روش استاندارد برای تعیین تیپ در کشورهای امریکایی محسوب می‌گردد (۱۵). با توجه به بررسی‌های انجام شده مشخص گردید که روش PCR ribotyping با توجه به تکرار پذیری ۱۰۰٪ و قدرت تفکیک ۹۸٪ و همچنین قابلیت انجام آسان و نیز ارائه نتایج دقیق در مدت زمان کوتاه، نسبت به سایر روش‌های مولکولی تایپینگ ارجحیت دارد (۱۶). *کلستریدیوم دیفیسیل* دارای نسخه‌های متعددی از ژن RNA می‌باشد که نه تنها بین سویه‌ها متفاوت هستند، بلکه بین نسخه‌های مختلف در یک ژنوم نیز می‌توانند متفاوت باشند. در این روش، از پرایمرهای اختصاصی مکمل نواحی اوپرون ژن RNA استفاده می‌شود. این پرایمرها به نواحی 16S و 23S ژن RNA ریبوزومی متصل می‌شوند (۱۷). در نهایت، تایپ باکتری‌ها بر اساس تفاوت در الگوهای حاصل از تکثیر منطقه Intergenic Spacer (ITS) بین 16S و 23S ژن RNA ریبوزومی تعیین خواهد شد. تفاوت در یک باند از این الگوها بیانگر ریبوتایپ جدید خواهد بود. با استفاده از این روش بیش از ۱۹۰ ریبو تایپ مختلف از منابع و مناطق جغرافیایی مختلف جداسازی گردیده است (۱۸).

با توجه به آنکه اسهال ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* یک مشکل اساسی در بیمارستان و جامعه محسوب می‌گردد و متاسفانه شیوع آن در کشورهای در حال توسعه به خصوص ایران در حال گسترش است، در این مطالعه سعی شد تا با استفاده از روش PCR ribotyping ، ریبوتایپ مشترک یا ریبوتایپ‌های غالب سویه‌های مختلف بالینی، به منظور شناسایی عفونت بیمارستانی و بررسی چرخش سویه‌ای خاص در بیمارستان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

تحقیق به روش مقطعی بر روی ۱۰۸ نمونه که از بخش‌های مختلف بیمارستان، طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹، به آزمایشگاه مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی به عنوان مرکز رفرانس ارسال شده بود، صورت پذیرفت. اطلاعات مربوط به هر بیمار با استفاده از پرسشنامه جمع‌آوری گردید. اطلاعات جمع‌آوری شده شامل سن، جنس، علایم بالینی، علایم آزمایشگاهی و بخش بستری بود.

نمونه‌های ارسال شده به آزمایشگاه جهت انجام کشت و تستهای تشخیصی بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند و در غیر این صورت تا زمان انجام سایر مراحل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت کشت باکتری‌ها، نمونه‌های مدفوع اسهالی در عرض کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل و بر روی محیط‌های اختصاصی کشت داده شدند. نمونه‌های مدفوع به دو قسمت جهت انجام تست‌های کشت و PCR تقسیم شدند. تمامی نمونه‌های مدفوع با شوک الکل و محیط عصاره مخمر تیمار شدند. در روش شوک الکل ابتدا ۱ گرم از نمونه مدفوع با هم حجم آن اتانول ۹۵ درجه به آرامی مخلوط و سپس به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس از محیط فوق روی محیط اختصاصی سیکلوسرین سفوکسیتین فروکتوز آگار (CCFA) غنی شده با ۵ درصد خون گوسفند و آنتی‌بیوتیک‌های سیکلوسرین (۲۵۰µg/ml) و سفوکسیتین (۸µg/ml) و محیط *کلستریدیوم دیفیسیل*

مـدیوم (*Clostridium difficile* medium ; Mast, UK) غنی شده با ۵ درصد خون گوسفند به روش خطی کشت داده شد. در روش تیمار با عصاره مخمر ابتدا ۱ گرم مدفوع بـا هـم حجم آن عصاره مخمـر (Yeast extract granulated; Merck, Germany) به آرامی مخلوط و سپس سوسپانسیون فوق روی محیط‌های CCFA و *کلستریدیوم دیفیسیل* مدیوم کشت داده شدند. تمامی پلیت‌های تلقیح شـده در شـرایط بـی‌هـوازی بـا استفاده از دستگاه (Anoxomat: MART Microbiology B.V. the Netherlands 0% O_2, 10% H_2, 10% CO_2, 80% N_2) بـه مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پلیت‌ها پس از گذشت ۴۸ ساعت مـورد بررسـی قـرار گرفتنـد. در صـورت مشاهده کلنی‌های گرد، کمی بر آمده، کدر، به رنگ خاکستری یا سـفید، بـوی شـبیه اصـطبل اسـب (horse-stable odor) و خاصیت فلورسنت در زیر نور اولتراویولت برای تشخیص قطعی از رنگ‌آمیزی گرم و PCR اختـصاصی بهـره گرفتـه شـد و در صورت عدم مشاهده کلنی پس از گذشت دو روز بـا توجـه بـه کند رشد بودن بعضی از سـویه‌هـای *کلـستریدیوم دیفیـسیل*، انکوباسیون به مدت ۵ روز ادامه یافـت و پلیـت‌هـا بـه صـورت روزانه بررسی شدند (۱۹).

در صورت رشد کلنی بر روی پلیت، برای تعیین هویت قطعـی و همچنین تعیین نوع توکسین، DNA بـاکتری بـا اسـتفاده از کیت استخراج (QIAamp (Qiagen, Hilden,Germany و بـر طبق دستورالعمل شـرکت سـازنده اسـتخراج و جـذب نـوری DNA اسـتخراج شـده در طـول مـوج ۲۶۰ نـانومتر بـه ۲۸۰ نانومتر توسط روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. در صورت تایید کیفیت، DNA در بـافر TE در دمـای ۲۰- تـا زمان انجام سایر مراحل نگهداری شد (۲۰).

بـرای تـشخیص و تعیـین هویـت *کلـستریدیوم دیفیـسیل* از پرایمرهـای اختـصاصیTim6 و Struppi6 شـرکت (Takara Shuzo Co., Ltd., Shiga, Japan) جهـت تکثیـر ژن *cdd-3* استفاده شد (۲۱). با استفاده از ایـن پرایمرهـا یـک قطعـه بـه طول ۶۲۲ جفت باز تکثیر شد. محصول PCR روی ژل آگارز با غلظت ۱/۲٪ در شرایط اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت، بـه مـدت ۲ ساعت جداسازی و بعد از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید باندهای حاصل مشاهده گردید. تمامی ایزوله‌های که PCR ژن *cdd-3* در مورد آنها مثبت شد، از نظر کد نمودن توکسین‌های نوع A و B مورد بررسی قرار گرفتند. توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ژنهای *cdd-3*، *tcdA*، *tcdB* در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ژن‌های *cdd-3*، *tcdA*، *tcdB*

ژن	پرایمر	توالی نوکلئوتید	طول قطعات
Cdd3	Tim6	5´TCC AAT ATA ATA AAT TAG CAT TCC A 3´	622 bp
	Struppi6	5´GGC TAT TAC ACG TAA TCC AGA TA 3´	
TcdA	TA1	5´ATG ATA AGG CAA CTT CAG TGG 3´	624 bp
	TA2	5´TAA GTT CCT CCT GCT CCA TCA A 3´	
TcdB	TB1	5´GAG CTG CTT CAA TTG GAG AGA 3´	412 bp
	TB2	5´GTA ACC TAC TTT CAT AAC ACC AG 3´	

محصول PCR ژن‌های کد کننده توکسین بوسیله الکتروفـورز در ۱/۲٪ ژل آگارز جداسازی و بعد از رنگ آمیـزی بـا محلـول اتیدیوم بروماید باندهای حاصل مشاهده گردید. الکتروفـورز در شرایط ولتاژ ۸۰V به مدت ۲ ساعت انجام شد. مـارکر بـه کـار رفته در الکتروفورز شامل Superladder-Low 100 bp شـرکت sigma بود. وجود ژن توکسین A با ایجاد قطعـه ای بـه طـول ۶۲۲ جفت بازی و ژن توکسین B با ایجاد قطعه ای بـه طـول ۴۱۲ جفت باز تایید گردید (۲۱).

برای تعیین ریبوتیپ سویه‌ها، DNA با استفاده از کیت تجاری (Insta Gene Matrix,Bio-Rad) chelex resin- based بـه روشی کـه قـبلا توسـط شـرکت سـازنده توصـیف شـده بـود اسـتخراج گردیـد (۲۲). بـرای تکثیـر ژن‌هـای ریبـوزومی از پرایمرهای اختـصاصیP3 (5′-CTG GGG TGA AGT CGT AACAAG-3′) و P5 (5′-GCG CCC TTT GTA GCT TGA CC-3′) شـرکت (Takara Shuzo Co., Ltd., Shiga, Japan) استفاده شد. برای انجام PCR در هر واکنش به حجم ۱۰۰µl مقـــدار ۵µl از الگـــو، ۱۰µl از بـــافر ۱۰x، ۲µl از dNTP (10mM) ، ۳µl از $MgCl_2$ (50mM)، 5µl از پرایمرهای P3 وP5 با غلظـت 10µM و 0.3µl از taq DNA پلی مراز اضـافه و بقیـه آن تـا حجـم ۱۰۰µl بـا آب مقطـر دیونایز شده کامل گردید. برنامه PCR جهت تکثیر ژن‌هـای ریبوزومی در ۳۵ سیکل تکرار به شرح ذیـل انجـام گردیـد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۶۰ ثانیه، اتصال الگو بـه پرایمـر(Annealing) در دمـای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیـه، گـسترش در دمـای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بـه مـدت ۹۰ ثانیـه و گـسترش نهـایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفـت. پس از پایان PCR برای افزایش غلظـت نهـایی محـصولات، درب میکروتیوب‌ها را باز کرده آنها را در دستگاه گرم کننده بـا دمـای ۴۵ درجـه بـه مـدت ۴۵ دقیقـه انکوبـه کـردیم. محـصول PCR بوسـیله الکتروفـورز در ژل ۲٪ آگـارز بـا

ولتاژ ۸۰ به مدت ۵ ساعت جداسازی شد. تصاویر باندها پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه GelDoc (Bio-Rad) به دست آمد. تجزیه و تحلیل الگوی باندی به دست آمده از سویه‌های مختلف توسط نرم افزار GelCompare (version 4.0; Applied Maths, Belgium) انجام پذیرفت. برای اطمینان از صحت آزمایش و بررسی تکرار پذیری نتایج، هر آزمایش برای هر نمونه ۳ بار تکرار گردید. در این پژوهش، شیوع نمونه‌های اسهالی واجد شرایط و توکسین مثبت تعیین و میزان واقعی آن Confidence Interval (CI) در جامعه مورد نظر برآورد و نوع ریبوتایپ‌های آنها مشخص گردید.

یافته‌ها

از ۱۰۸ نمونه اسهالی ارسال شده از بیماران بخش‌های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه رفرانس مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی، ۱۷ (۱۵/۷٪) نمونه واجد شرایط وجود داشت. با توجه به شیوع عفونت ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* در بیماران اسهالی میزان واقعی آن با احتمال ۹۰٪ از حداقل ۱۰ تا حداکثر ۲۱/۴ درصد برآورد می‌گردد. خصوصیات بالینی ایزوله‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* در جدول ۲ ارائه شده است.

تمامی بیماران مبتلا به اسهال بودند. مدت زمان بستری در بیمارستان ۱۰/۳±۷/۴ روز بود. ۸۵٪ بیماران دارای سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک بودند. ۱۵٪ بیماران هیچ گونه آنتی‌بیوتیکی دریافت نکرده بودند، ولی از نظر ابتلا به *کلستریدیوم دیفیسیل* و وجود هر دو نوع توکسین A و B مثبت بودند. بیشترین فراوانی ایزوله‌های مثبت مربوط به بخش داخلی و ICU (۲۳/۵٪) و کمترین فراوانی ایزوله‌ها مربوط به بخش انکولوژی (۵/۹٪) بود. بیشتر از ۹۰ درصد بیماران بستری در بخش عفونی از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون و ماکرولیدها استفاده کرده بودند.

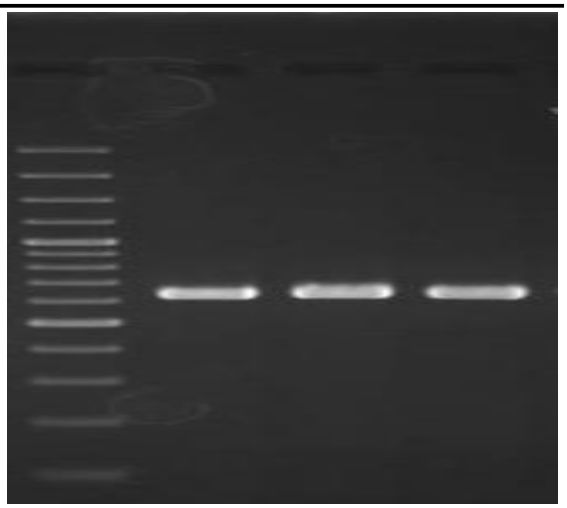
تمامی نمونه‌هایی که از نظر کشت *کلستریدیوم دیفیسیل* مثبت ارزیابی شدند، در مرحله بعد با استفاده از PCR اختصاصی ژن *cdd-3* جهت تعیین هویت *کلستریدیوم دیفیسیل* به عنوان یک ژن حفظ شده در تمام سویه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شکل ۱ نتایج محصول PCR را بعد از انجام الکتروفورز نشان می‌دهد. در این شکل، وجود باند ۶۲۲ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن نتیجه جهت شناسایی *کلستریدیوم دیفیسیل* محسوب می‌گردد. در مرحله بعد با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن *tcdA* و *tcdB* توکسین نوع A و B مورد بررسی قرار گرفتند.

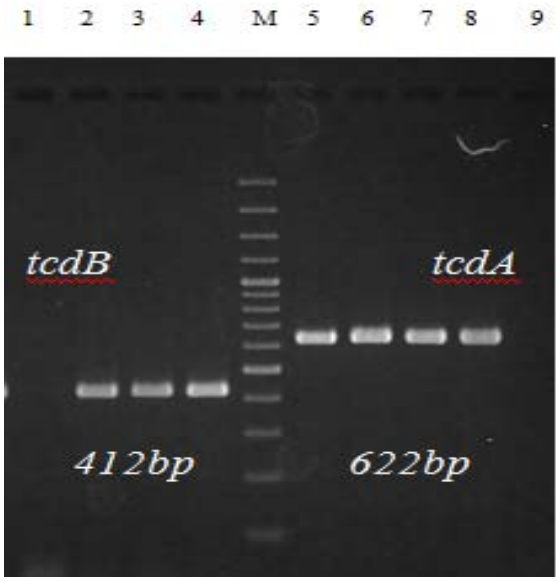
جدول ۱- خصوصیات بیماران مبتلا به عفونت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل

خصوصیت	تعداد (٪)
جنسیت	
مرد	۱۰(۵۸/۸)
زن	۴ (۴۱/۲)
سن بیماران (سال)	
<۵۰	۸ (۴۷/۱)
۵۱-۶۵	۳ (۱۷/۶)
>۶۵	۶(۵۳/۳)
مدت زمان بستری شدن در بیمارستان (روز)	۱۰/۳±۷/۴
علایم آزمایشگاهی	
نوتروپنی	۱(۵/۹)
لکوسیتوز	۳ (۱۷/۶)
خون در مدفوع	۲(۱۱/۸)
فاقد علایم	۱۱(۶۴/۷)
علایم بالینی	
تب	۹(۵۲/۹)
اسهال	۱۷ (۱۰۰)
درد شکم	۱۲(۷۰/۵)
استفاده قبلی از آنتی بیوتیک	
سفالوسپورین	۱۵ (۸۸/۲)
پنی سیلین	۱۳ (۷۶/۴)
کلیندامایسین	۵ (۲۹/۴)
مترونیدازول	۶(۱۶/۷)
ونکومایسین	۴ (۲۳/۵)
دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها	۳ (۱۷/۶)

شکل ۲ نتایج محصول PCR توکسین نوع A و نوع B بعد از انجام الکتروفورز را نشان می‌دهد. در این شکل، وجود باند ۴۱۲ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن tcdB و وجود باند ۶۲۲ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن tcdA می‌باشد. فراوانی ایزوله‌های با پروفایل توکسینی A+B+ ۱۲ (۷۰/۵۹٪)، A+B- ۱(۵/۹٪) و A-B+ ۴ (۲۳/۹٪) گزارش شد. فراوانی ایزوله‌های با پروفایل توکسینی A-B+ ۲۳/۹٪ بود که ۱ (۲۵٪) از بخش گوارش، ۱ (۲۵٪) از بخش عفونی و ۲ (۵۰٪) از بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) جداسازی شد.



شکل ۱- نتایج الکتروفورز به دست آمده از PCR ژن *cdd-3* بیماران. لاین M: مارکر100 bp، ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف ۲: نمونه مثبت بیمار، ردیف ۳ :کنترل مثبت



شکل ۲- نتایج PCR ژن توکسین A و B *کلستریدیوم دیفیسیل*. ردیف ۱: کنترل منفی ژن *tcdB*، ردیف ۲ و ۳: نمونه مثبت بیمار از نظر تولید توکسین B، ردیف ۴: کنترل مثبت ژن *tcdB*، ردیف M: ladder 100 bp، ردیف ۵ و ۶ و ۷: نمونه مثبت بیمار از نظر تولید توکسین A، ردیف ۸: کنترل مثبت ژن *tcdA*، ردیف ۹: کنترل منفی ژن *tcdA*.

همگی این افراد دارای بیماری زمینه‌ای و سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و آمینوگلیکوزیدی و ایمنوساپرس بودند. توزیع فراوانی تایپ‌های مختلف توکسین در بین ایزوله‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* به تفکیک بخش‌ها در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳- پروفایل توکسین‌زایی سویه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل*

بخش	A^+B^-	A^-B^+	A^+B^+	مجموع
ICU	-	۲(۱۱/۸)	۲(۱۱/۸)	۴(۲۳/۶)
داخلی	۱(۵/۹)*	-	۳(۱۷/۷)	۴(۲۳/۶)
گوارش	-	۱(۵/۹)	۲(۱۱/۸)	۳(۱۷/۷)
جراحی	-	-	۳(۱۷/۷)	۳(۱۷/۷)
عفونی	-	۱(۵/۹)	۱(۵/۹)	۲(۱۱/۸)
انکولوژی	-	-	۱(۵/۹)	۱(۵/۹)

* تعداد (درصد)

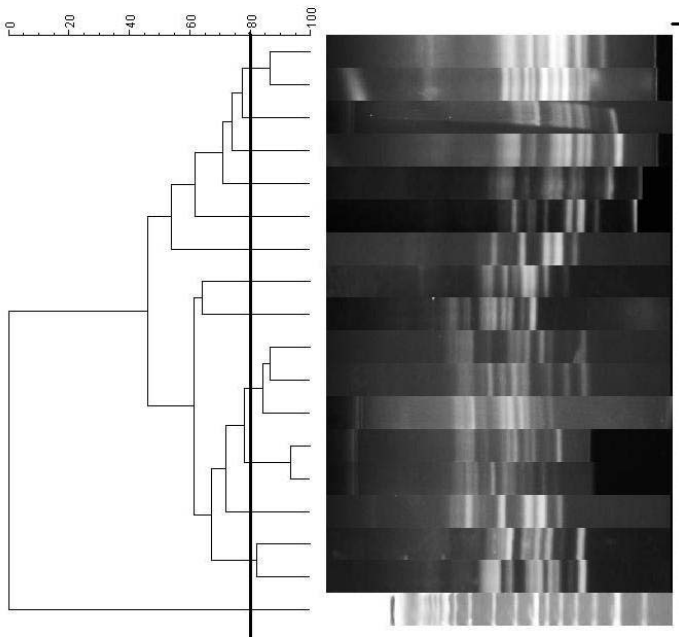
ریبوتایپ مولکولی *کلستریدیوم دیفیسیل* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام پذیرفت. آنالیز الگوی ریبوتایپ ۱۷ سویه مورد آزمایش توسط نرم افزار GelCompare II در جدول ۴ ارائه شده است.

مقایسه این الگوها نشان داد که الگوی ریبوتایپ مربوط به سویه ۳۲-۴و ۲۳-۶ به میزان ۸۶٪ مشابه به هم بودند (R1 و R2). این دو سویه از نظر پروفایل توکسینی، بخش بستری، بیماری زمینه‌ای و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با یکدیگر تفاوت داشتند. دو سویه ۲۷-۵ و ۲۷-۶ نیز از نظر الگوی باندی به دست آمده ۸۶٪ مشابه بهم بودند (R10 و R11) در حالی که این دو سویه از نظر پروفایل توکسینی، بخش بستری، بیماری زمینه‌ای و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با یکدیگر تفاوت داشتند. سویه ۲۶-۱ با سویه‌های ۲۷-۵ و ۲۷-۶ دارای ۸۴٪ تشابه بودند (R12). دو سویه ۲۴-۱ و ۲۴-۵ دارای ۹۲٪ تشابه الگوی ریبوتایپ بودند (R13 و R14). هر دو سویه دارای پروفایل توکسینی A^+B^+ و نقص عملکرد کلیه بودند، ولی از بخش‌های متفاوت جداسازی شدند. سویه‌های ۴-۴ و ۴-۵ دارای ۸۲٪ تشابه الگوی ریبوتایپ بودند (R16 و R17). بقیه سویه‌ها از الگوی باندی متفاوت (ریبوتایپ غیر همسان) تبعیت می‌کردند.

بحث

تحقیق نشان داد که از ۱۷ نمونه مورد بررسی تمامی نمونه‌ها دارای الگوی ریبوتایپی متفاوت بودند. تایپینگ ارگانیسم‌ها یکی از کاربردی‌ترین روش‌های تکنیکی در بررسی‌های اپیدمیولوژیک محسوب می‌شود، زیرا به کمک این روش‌ها می‌توان به منشا عفونت پی برد. تعیین نوع میکروارگانیسم‌ها با استفاده از روش‌های مختلف فنوتیپی و مولکولی انجام می‌پذیرد. امروزه روش‌های مولکولی به دلیل دقت و تکرارپذیری بالا از اهمیت خاصی برخوردار هستند. استفاده از این روش‌ها با دقت بالا منجر به تعیین نوع میکروارگانیزم شده که می‌تواند در مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد

جدول ۴- آنالیز الگوی ریبوتایپینگ ایزوله‌های جدا شده از بیماران بستری در بخش‌ها



ایزوله	نام بخش	پروفایل توکسینی	ریبوتایپ
c. diff 23-4	داخلی	A+/B-	R1
c. diff 23-6	ICU	A+/B+	R2
c. diff 25-1	ICU	A+/B+	R3
c.diff 23-7	ICU	A-/B+	R4
c. diff 15-7	انکولوژی	A+/B+	R5
c. dif 15-1	جراحی	A+/B+	R6
c. diff 21-4	گوارش	A+/B+	R7
c. diff 4-2	عفونی	A+/B+	R8
c.diff 1-5	داخلی	A+/B+	R9
c. diff 27-5	عفونی	A-/B+	R10
c. diff 27-6	داخلی	A+/B+	R11
c. diff 26-1	گوارش	A-/B+	R12
c. diff 24-1	جراحی	A+/B+	R13
c. diff 24-5	داخلی	A+/B+	R14
c. diff 27-7	جراحی	A+/B+	R15
c. diff 4-4	گوارش	A+/B+	R16
c. diff 4-5	ICU	A-/B+	R17
standard			

(۲۳). شیوع ایزوله‌های توکسین‌زا بسته به منطقه جغرافیایی و کشور مورد مطالعه متفاوت می‌باشد. دراین بررسی، فراوانی ایزوله‌های با پروفایل توکسینی A^+B^+ در ۱۲ (۷۰/۵۹٪) ایزوله دیده شد، این در حالی است که در مطالعه‌ای که در اسپانیا در سال ۲۰۰۵ انجام شد، شیوع سویه‌های A^+B^+ را ۴/۵٪گزارش کردند (۲۴). در مطالعه مشابهی که در کره انجام شد، شیوع ایزوله‌های A^+B^+ به میزان ۵۶/۹٪ گزارش شد (۲۵).

در مطالعه حاضر از ۱۷ ایزوله توکسین‌زا تعداد ۴ ایزوله (۲۳/۵٪) به صورت پروفایل توکسینی A^-B^+ بودند. در مطالعه انجام شده در اروپا شیوع سویه های A^-B^+ ۶/۲٪ گزارش شد (۲۶). در مطالعه مشابهی که در کانادا انجام شد شیوع ایزوله‌های A^-B^+ ۲/۳٪ گزارش شد (۲۷). فراوانی سویه‌های A^-B^+ در چین ۳۳/۳٪ و در کره ۲۷/۵٪ و در ژاپن ۶/۳٪ گزارش شد (۲۸، ۲۵). این در حالی است که فراوانی این ایزوله‌ها در سوئد صفر گزارش شد (۲۸). این مطالعات نشان می‌دهند که فراوانی سویه‌های توکسین‌زای *کلستریدیوم دیفیسیل* در نقاط مختلف جغرافیایی متفاوت بوده و نیاز به بررسی مستمر دارد. سویه‌های A^+B^- بسیار نادر هستند و گزارش‌های اندکی از آنها وجود دارد. یک مطالعه در دانمارک که در سال ۲۰۰۸ انجام شد، از مجموع ۱۵۹ ایزوله بررسی شده تنها یک ایزوله A^+B^- گزارش شد (۲۹). تحقیقات انجام شده توسط Jhonson و همکارانش حاکی از آن است که سویه‌های A^-B^+ از نظر حدت و شدت علایم بالینی بسیار حائز اهمیت بوده و به نظر می‌رسد که این سویه‌ها از یک منشا واحد بوده و به طور گسترده در اروپا و شمال امریکا در حال گسترش می‌باشد (۳۰).

در مطالعه حاضر هیچ گونه تشابه ریبوتایپی بین سویه‌های واجد شرایط و نیز ریبوتایپ غالبی شناسایی نشد. با توجه به پراکندگی ریبوتایپ‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی نتایج این تحقیق متناسب با تحقیقات صورت گرفته در کشورهایی نظیر کویت، انگلستان، مجارستان بود (۳۳-۳۱). نتایج به دست آمده از مطالعه ما بیان می‌کند که ریبوتایپ سویه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* در بیمارستان مورد بررسی متفاوت بودند. بسیاری از مطالعات انجام شده روی CDI حاکی از آن است که انتشار CDI در بیمارستان به دلیل گردش سویه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* با تیپ مشابه ایجاد می‌گردد، در حالی که بعضی دیگر نشان دادند که گونه‌های متفاوتی از این میکروارگانیزم در انتقال عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری نقش دارند (۳۴،۳۵). در مورد سویه های ۲۳-۴، ۲۳-۶ و ۲۷-۶، ۲۷-۲۶،۵-۱ و ۲۴-۱، ۲۴-۵ و ۴-۴، ۴-۵ که در تحقیق حاضر با یکدیگر تشکیل گروه داده‌اند و الگوی ریبوتایپ آنها بیشتر از ۸۰٪ با هم هم‌خوانی دارد، بررسی‌های به عمل آمده نشان دهنده آن است که سویه‌های ذکر شده از نظر پروفایل توکسینی، بخش بیمارستان و زمان جداسازی سویه‌ها از نظر فصل و ماه هیچ گونه ارتباطی با یکدیگر نداشتند. بنابراین احتمال می‌رود که سویه‌های مشابه یا در فواصل زمانی متفاوت از محیط کسب شده باشند و یا آن که از دو سویه مشابه یکی از سویه‌ها از محیط کسب شده است و

چون باکتری مورد نظر قادر به تولید اسپور بوده و اسپور آن نسبت به شرایط محیطی بسیار مقاوم است، سویه مورد نظر دوباره در محیط منتشر و در شرایط نامناسب تبدیل به اسپور شده است. سپس بیمار بعدی در اثر ابتلا به اسپور این باکتری سویه را با ریبوتایپ مشابه از محیط کسب کرده باشد.

با توجه با آنکه در روش ریبوتایپینگ تفاوت در یک باند از الگوها بیانگر ریبوتایپ جدید خواهد بود، در بررسی حاضر مشخص گردید که تمامی سویه‌ها دارای الگوی ریبوتایپینگ متفاوت هستند. این مطلب بیانگر آن است که سویه‌های جدا شده از بیماران بستری در بخش‌ها از یک منشا نبوده و به نظر می‌رسد که آلودگی بیماران بستری با این سویه‌ها به دلیل عفونت اندوژن، انتشار سویه‌ها از خارج به داخل بیمارستان و عدم گردش سویه‌ای خاص در بخش‌های مختلف به دلیل انجام اقدامات احتیاطی به موقع در زمینه کنترل عفونت و همچنین استقرار مناسب موقعیت فیزیکی بخش‌ها باشد. به طور کلی تعیین نوع برای پیدا کردن منبع عفونت درعفونت‌های حاصل از این باکتری در بیمارستان لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

در این تحقیق متاسفانه امکان مقایسه الگوی تایپینگ سویه‌های مورد بررسی با سویه‌های شناخته شده رفرانس وجود نداشت. یکی از محدودیت‌های این مطالعه حجم کم نمونه مورد بررسی بود. پیشنهاد می‌شود که مطالعات در جامعه آماری گسترده‌تر و با حجم نمونه بیشتر جهت تعیین سویه‌های شایع در مراکز درمانی و نیز شناسایی ریبوتایپ آنها به منظور پی بردن به منشا عفونت با این باکتری صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه همکاران گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و همکاران مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Sadeghifard N, Salari MH, Ghassemi MR, Shirazi MH, Feizabadi MM, Kazemi B, et al. Prevalence of *Clostridium Difficile*- associated diarrhea in hospitalized patients with nosocomial diarrhea. Iranian J Pub Health.2005; 34:67-72.
2. Leroi MJ, Siarakas S, Gottlieb T. E test susceptibility testing of nosocomial *Clostridium difficile* isolates against metronidazole, vancomycin, fusidic acid and the novel agents moxifloxacin, gatifloxacin, and linezolid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:72-74.
3. Geric B, Rupnik M, Gerding DN, Grabnar M, Johnson S. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. J Med Microbiol 2004; 53:887-94.
4. Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L, CDAD-CSI Study Group. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Québec, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:3473-75.
5. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile* associated enteric disease. Ann Intern Med 2006; 145:758-64.
6. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1992; 15:573-81.
7. Svenungsson B, Burman LG, Jalakas-Pörnull K, Lagergren A, Struwe J, Akerlund T. Epidemiology and molecular characterization of *Clostridium difficile* strains from patients with diarrhea: low disease incidence and evidence of limited cross-infection in a Swedish teaching hospital. J Clin Microbiol 2003; 41: 4031-37.
8. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 247-63.
9. Wozniak G, Trontelj P, Rupnik M. Genomic relatedness of *Clostridium difficile* strains from different toxinotypes and serogroups. Anaerobe 2000; 6: 261-67.
10. Sambol SP, Merrigan MM, Lyerly D, Gerding DN, Johnson S. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. Infect Immun 2000; 68:5480-87.
11. Rupnik M, Grabnar M, Geric B. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. Anaerobe 2003; 9: 289–94.
12. Vandenberg RJ, Claas EC, Oyib DH, Klaassen CH, Dijkshoorn L, Brazier JS, et al. Characterization of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive *Clostridium difficile* Isolates from Outbreaks in Different Countries by Amplified Fragment Length Polymorphism and PCR Ribotyping. J Clin Microbiol 2004; 42: 1035–41.
13. Brazier JS. Typing of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 428–31.
14. Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. J Med Microbiol 2007; 56: 921-29.

15. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed- field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. J Clin Microbiol 2008; 46: 431-37.

16. Bidet P, Lalande V, Salauze B, Burghoffer B, Avesani V, Delmée M, et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2484-87.

17. Rupnik M, Brazier JS, Duerden BI, Grabnar M, Stubbs SL. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. Microbiology 2001; 147: 439–47.

18. Indra A, Blaschitz M, Kernbichler S, Reischl U, Wewalka G, Allerberger F. Mechanisms behind variation in the *Clostridium difficile* 16S–23S rRNA intergenic spacer region. J Med Microbiol 2010; 59:1317–23.

19. Arroyo L, Rousseau J, Willey B, Low D, Staempfli H, McGeer A, et al. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. J Clin Microbiol 2005; 43:5341–43.

20. Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, Peregrine AS. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Calves, Canada. Emerg Infect Dis 2006; 12:1730-36.

21. Cohen SH, Tang YJ, Silva JR. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. J Infect Dis 2000; 181: 659-63.

22. Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. J Med Microbiol 2005; 54:163–66.

23. Poilane I, Humeniuk-Ainouz C, Durand I, Janoir C, Cruaud P, Delmee M, et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* clinical isolates in a geriatric hospital. J Med Microbiol 2007; 56: 386–90.

24. Alonso R, Martin A, Pelaez T, Martin M, Rodriguez-Creixe M, Bouza E . Toxigenic status of *Clostridium difficile* in a large Spanish teaching hospital. J Med Microbiol 2005; 54: 159–62.

25. Kim H, Jeong SH, Roh KH, Hong SG, Kim JW, Shin MG, et al. Investigation of Toxin Gene Diversity, Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance of *Clostridium difficile* Isolated from 12 Hospitals in South Korea. Korean J Lab Med 2010; 30: 491-97.

26. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect 2007; 13:1048-57.

27. Martin H, Willey B, Low DE, Staempfli HR, McGeer A, Boerlin P, et al. Characterization of *Clostridium difficile* Strains Isolated from Patients in Ontario, Canada, from 2004 to 2006. J Clin Microbiol 2008;46:2999-3004.

28. Huang H, Fang H, Weintraub A, Nord CE. Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in *Clostridium difficile* from Shanghai and Stockholm. Clin Microbiol Infect 2009; 15:1170-73.

29. Persson S, Torpdahl M, Olsen K. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 1057–64.

30. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, Delmée M, Avesani V, Merrigan MM, et al. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. J Clin Microbiol 2003; 41: 1543–47.

31. Rotimi VO, Gamal WY, Mokaddas EM, Brazier JS, Johny M, Duerden BI. Prevalent PCR ribotypes of clinical and environmental strains of *Clostridium difficile* isolated from intensive-therapy unit patients in Kuwait. J Clin Microbiol 2003; 52: 705-709.

32. John R, Brazier JS. Antimicrobial susceptibility of polymerase chain reaction ribotypes of *Clostridium difficile* commonly isolated from symptomatic hospital patients in the UK. J Hosp Infect 2005; 61: 11–14.

33. Urban E, Brazier JS, Soki J, Nagy E, Duerden BI. PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. J Med Microbiol 2001; 50: 1082-86.

34. Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML, et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe. Euro Surveill 2008; 13: 1–7.

35. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hyper virulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis 2008; 47: 1162–70.